



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1621号
学位記番号	第1156号
氏名	藤田 和彦
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	<p>HSP90 inhibitors potentiate PGF2α-induced IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts (骨芽細胞において HSP90 阻害剤は p38 MAP kinase を介して PGF2α による IL-6 産生を促進する)</p> <p>PLoS One Vol.12: e0177878, 2017</p>
論文審査担当者	<p>主査： 和田 郁雄 副査： 岡本 尚, 大塚 隆信</p>

【目的】

Heat shock protein (HSP)は熱及び化学的刺激など様々な外的ストレスに反応して細胞内で誘導される一連の蛋白質である。HSP は分子シャペロンとして機能し、生体防御機構において中心的な役割を担うと考えられている。HSP90 は非ストレス下においても細胞内で高発現しており、グルココルチコイド受容体の制御等生理的な細胞機能において重要な役割を果たしていることが明らかとされてきている。HSP90 は多くの癌細胞において過剰発現しており、その標的タンパク質が癌の進展に関与していることから、HSP90 の阻害剤は抗癌剤としての新たな治療戦略となっている。骨代謝は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞により巧緻に制御され、骨量は適切に維持されている。骨吸収とそれに引き続く骨形成によって絶えず骨リモデリングされ骨質および骨密度は維持されている。しかし骨代謝において、HSP90 の役割の詳細は未だ明らかとされていない。

Interleukin-6 (IL-6) は骨吸収因子として作用し、破骨細胞の分化誘導を促進することが知られている。また最近では IL-6 が骨代謝調節因子としても機能し、骨折治癒過程に役割を担っていることが明らかとされてきている。一方 prostaglandin (PGF_{2α})はオータコイドとして骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしている。私共の研究室では既に骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PGF_{2α} が p44/p42 MAP kinase 及び p38 MAP kinase を介して IL-6 の産生を促進すること、さらに Rho-kinase が p38 MAP kinase の上流で促進的に機能していることを明らかとしている。本研究では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PGF_{2α} による IL-6 産生における HSP90 の役割を検討した。

.....

【方法】

新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含む α-MEM 培地で 5 日間培養後、牛胎仔血清を 0.3%とし、48 時間後に実験に供した。HSP90-knockdown 細胞は、MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含むα-MEM 培地で 2 日間培養後、HSP90-siRNA を導入し、24 時間後に牛胎仔血清を 0.3%とした後、実験に供した。HSP90 の 阻 害 剤 (geldanamycin 、 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) 、 17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG)及び onalespib) 及び p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 で前処置した MC3T3-E1 細胞を PGF_{2α} で刺激し、上清中の IL-6 濃度を ELISA 法で、IL-6 mRNA の発現を RT-PCR 法にて測定した。また p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び MYPT-1 のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

.....

【結果】

HSP90 の阻害剤は PGF_{2α} 刺激による IL-6 の遊離を時間依存的および濃度依存的に増強した。また HSP90 の阻害剤は PGF_{2α} 刺激による IL-6 mRNA の発現を増幅した。HSP90 の阻害剤は PGF_{2α} 刺激による p44/p42 MAP kinase 及び Rho-kinase の substrate である MYPT-1 のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかった。一方、PGF_{2α} による p38 MAP kinase のリン酸化は HSP90 の阻害剤により有意に増強された。また HSP90-knockdown 細胞においても PGF_{2α} 刺激による p38 MAP kinase のリン酸化は有意に増強された。さらに SB203580 は HSP90 の阻害剤による PGF_{2α} の IL-6 遊離の増強を有意に抑制した。

.....

【考察】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において HSP90 の阻害剤は $\text{PGF}_{2\alpha}$ 刺激による IL-6 の産生を増強することが示された。既に本細胞において、p44/p42 MAP kinase 及び Rho-kinase/p38 MAP kinase が $\text{PGF}_{2\alpha}$ による IL-6 の産生において促進的に作用していることを明らかとしている。今回、HSP90 の阻害剤は p44/p42 MAP kinase 及び MYPT-1 のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかった一方、p38 MAP kinase のリン酸化を有意に増強したことから、HSP90 の阻害剤は Rho-kinase と p38 MAP kinase の間で作用していると考えられた。以上のことから、骨芽細胞において HSP90 は p38 MAP kinase を介し $\text{PGF}_{2\alpha}$ による IL-6 産生を抑制的に制御していることが明らかとなった。HSP90 の阻害剤は骨芽細胞において IL-6 の産生を促進し、骨リモデリングを制御する可能性が示唆された。今後 HSP90 の阻害剤が抗癌剤治療のみならず、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の治療戦略となることが示唆された。

.....

【結論】

骨芽細胞において HSP90 阻害剤は p38 MAP kinase を介し、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ による IL-6 の産生を促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】 Heat shock protein (HSP)は様々な外的ストレスに反応して細胞内で誘導され、分子シャペロンとして機能し、生体防御機構において中心的な役割を担うと考えられている。HSP90 は多くの癌細胞において過剰発現しており、HSP90 の阻害剤は抗癌剤としての新たな治療戦略となっている。骨代謝は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞により巧緻に制御され、骨量は適切に維持されている。しかし骨代謝において、HSP90 の役割の詳細は未だ明らかとされていない。Interleukin-6 (IL-6) は骨吸収因子として作用し、破骨細胞の分化誘導を促進することが知られている。一方 prostaglandin F2 α (PGF2 α)はオータコイドとして骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしている。また骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PGF2 α が p44/p42 MAP kinase 及び p38 MAP kinase を介して IL-6 の産生を促進すること、さらに Rho-kinase が p38 MAP kinase の上流で促進的に機能していることも明らかにされている。本研究では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PGF2 α による IL-6 産生における HSP90 の役割を検討した。

【方法】 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含む α -MEM 培地で 5 日間培養後、牛胎仔血清を 0.3%として 48 時間培養後に実験に供した。HSP90-knockdown 細胞は、MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含む α -MEM 培地で 2 日間培養後、HSP90-siRNA を導入し、24 時間後に牛胎仔血清を 0.3%とした後、実験に供した。HSP90 の阻害剤 (geldanamycin、17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)、17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG)及び onalespib) 及び p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 で前処置した MC3T3-E1 細胞を PGF2 α で刺激し、上清中の IL-6 濃度を ELISA 法で、IL-6 mRNA の発現を RT-PCR 法にて測定した。また p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び MYPT-1 のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

【結果】 HSP90 の阻害剤は PGF2 α 刺激による IL-6 の遊離を増強し、IL-6 mRNA の発現も増幅した。HSP90 の阻害剤は PGF2 α 刺激による p44/p42 MAP kinase 及び Rho-kinase の substrate である MYPT-1 のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかったが、p38 MAP kinase のリン酸化は HSP90 の阻害剤により有意に増強された。また HSP90-knockdown 細胞においても PGF2 α 刺激による p38 MAP kinase のリン酸化は有意に増強された。

【考察】 骨芽細胞において HSP90 は p38 MAP kinase を介し PGF2 α による IL-6 産生を抑制的に制御していることが明らかとなった。HSP90 の阻害剤は骨芽細胞において IL-6 の産生を促進し、骨リモデリングを制御する可能性が示唆された。今後 HSP90 の阻害剤が抗癌剤治療のみならず、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の治療戦略となることが示唆された。

【審査の内容】 主査の和田教授より、HSP90 阻害剤の作用機序、IL-6 の発見の経緯、骨代謝での IL-6 の関与について等 6 項目、第 1 副査の岡本教授より、各実験結果の解釈について、MC3T3-E1 細胞の性質や HSP90-siRNA を用いた実験について、骨代謝における HSP90 の役割について等 12 項目、第 2 副査の大塚教授より、骨粗鬆症におけるリエゾンサービスおよび骨粗鬆症起因骨折の最新治療について等 4 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者から概ね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に把握しており、また大学院修了者としての学力を備えていると判断した。本研究は HSP の 1 つである HSP90 の骨代謝における役割の一端を明らかとする重要な研究であり高く評価された。よって、本論文著者は、博士 (医学) の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 和田 郁雄

副査 岡本 尚 大塚 隆信